

#2



Bescheinigung

Die BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT in 3550 Marburg hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Stabilisierte Faktor VIII-Präparationen"

am 9. April 1991 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizufügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit dem am 9. April 1991 eingereichten Original überein.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole A 61 K 37/02 und C 07 K 15/06 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 20. Januar 1992
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Röske

Aktenzeichen P 41 11 393.4

Stabilisierte Faktor VIII-Präparationen

Die Erfindung betrifft stabilisierte Lösungen mit
5 F VIII-Koagulationsaktivität, ein Verfahren zu ihrer
Herstellung sowie ihre Verwendung.

Der Gerinnungsfaktor VIII:C (F VIII:C) ist ein Plasma-
protein und wesentlich für den Ablauf des intrinsischen
10 Wegs der Blutgerinnung. Ein Mangel an oder Defekt des
Blutgerinnungsfaktors VIII:C führt zu einer lebensge-
fährdenden Störung der Blutgerinnung, der Haemophilie A.
Zur Therapie der Haemophilie A werden Konzentrate des
F VIII:C aus Humanplasma oder gentechnisch hergestellter
15 F VIII:C eingesetzt.

Diese F VIII-Präparate unterscheiden sich bezüglich
ihrer Reinheit, d.h. dem Vorhandensein von nicht gerin-
nungsaktiven Proteinen neben dem Wirkstoff F VIII:C. Als
20 ein "Very High Purity"-F VIII (VHP-F VIII:C) wird ein F
VIII bezeichnet, der mehr als 1000 U/mg vor einer
Stabilisierung mit Albumin aufweist (WHO, Expert
Committee on Biological Standardization).

25 Solche VHP-F VIII:C haben potentielle Vorteile bei der
Behandlung der Haemophilie. Diese sind die Virusfreiheit
und ein sehr geringer Gehalt an Fremdprotein, wodurch
nach Gabe dieser Konzentrate das Immunsystem der Pati-
enten weniger stark belastet würde. Der an sich mögliche
30 Vorteil, durch Gabe einer F VIII-Präparation mit hoher

spezifischer Aktivität das Immunsystem eines haemophilen Patienten weniger stark zu belasten, wird jedoch dadurch zunichte gemacht, daß man zur Stabilisierung des VHP-F VIII hohe Albumin-Konzentrationen dem hochgereinigten Präparat zusetzt. Durch diesen Zusatz an Albumin erreichen die hochgereinigten F VIII-Konzentrate in ihrer Endformulierung spezifische Aktivitäten von nur 3 - 10 U/mg.

Wenngleich der Zusatz von Albumin in Bezug auf die Virussicherheit nur eine geringe Gefahr birgt, so ist jedoch zu bedenken, daß bei der durchschnittlichen Reinheit des Albumin von 95 % wiederum unerwünschte Begleitproteine dem Patienten appliziert werden, die sein Immunsystem belasten können.

Es sind "High Purity" F VIII-Präparate bekannt, die auf einen Zusatz von Albumin zur Stabilisierung des F VIII verzichten (Schwinn, Smith & Wolter, Drug Res. 39 (1989), 1302). Diese Präparate erreichen spezifische Aktivitäten von ca. 100 U/mg Protein. Bezogen auf eine maximal erreichbare F VIII-Aktivität von ca. 5000 U/mg bedeutet das, daß nur ca. 2 % des Proteingehaltes dieser Präparationen aus F VIII:C Protein bestehen. Eine Stabilisierung dieser 2 % F VIII:C durch die 98 % Begleitproteine ist hier anzunehmen, da ein großer Teil dieser Begleitproteine dem von Willebrand-Faktor (vWF) zuzurechnen sind. Bekanntermaßen hat der von Willebrand-Faktor eine stabilisierende Wirkung auf den F VIII:C.

Anders bei Very High Purity Präparaten mit spezifischen Aktivitäten, die vor Albuminstabilisierung gewöhnlich mehr als 25fach höher als bei High Purity Präparaten liegen, und deren Gehalt an vWF sehr gering ist. Dieser geringe Anteil an vWF kann nicht mehr für eine ausreichende F VIII-Stabilisierung sorgen, so daß die F VIII-

Aktivität in nicht mit Albumin stabilisierten Lösungen rasch abnimmt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein
5 Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die Herstellung einer hochkonzentrierten, physiologisch verträglichen Lösung eines VHP-F VIII:C-Präparates erlaubt, welche keinen Zusatz von Proteinen zur Stabilisierung benötigt.

10 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zu einer VHP-F VIII:C-Präparation eine Aminosäure oder eines ihrer Salze, Derivate oder Homologe zugegeben wird. Es können L- und/oder D-Aminosäuren zugesetzt werden. Besonders geeignet sind Arginin, Lysin, Ornithin,
15 Guanidinoessigsäure oder andere, deren gemeinsames Merkmal eine basische Gruppierung in Form einer Amino- und/oder Guanidinogruppe ist.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine Lösung mit
20 Faktor VIII:C-Aktivität enthaltend eine Aminosäure oder eines ihrer Salze oder Derivate und gegebenenfalls ein Detergenz oder ein organisches Polymer.

Bevorzugte Ausführungsformen sind:
25 eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure eine natürliche Aminosäure ist;
eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure eine basische Aminosäure ist;
eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß sie Arginin und
30 Glycin enthält;
eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Aminosäure 0.001 bis 1 mol/l ist;
eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein organisches Polymer oder ein nicht-ionisches
35 Detergenz enthält;

eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß die F VIII:C-Aktivität von humanem Faktor VIII in seiner im Plasma vorkommenden Form oder einem gentechnisch hergestellten Faktor VIII:C oder einem Derivat von diesen herrührt;
5 und eine Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische F VIII:C-Aktivität mindestens 1000 IU/mg beträgt.

Eine bessere Stabilisierung wird erreicht durch Kombination von Aminosäuren oder ihrer Derivate oder mit
10 einem nicht-ionischen Detergenz wie ^RPolysorbate 20 oder ^RPolysorbate 80 oder einem organischen Polymer wie Polyethylenglykol 1500.

Als besonders geeignet zur Herstellung einer stabilen,
15 albumin-freien VHP-F VIII:C-Lösung hat sich eine Kombination der Aminosäuren Arginin und Glycin, bevorzugt 0.01 bis 1 mol/l mit dem nicht-ionischen Detergenz ^RTween 80, bevorzugt 0.001 bis 0.5 % (v/v) und einem Neutralzucker wie Saccharose, bevorzugt 0.1 bis 10 %
20 gezeigt.

Der pH-Wert einer solchen Lösung wird mittels einer organischen Säure, bevorzugt 10 %ige Essigsäure, zwischen pH 5.5 und 8.5, bevorzugt zwischen pH 6.5 und 7.5
25 eingestellt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Arzneimittel enthaltend eine solche Lösung. Dieses Arzneimittel kann außer einer solchen Lösung übliche, pharmazeutisch
30 verträgliche, stabilisierende und/oder puffernde Substanzen enthalten, besonders ein Kohlenhydrat.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Lösung, wobei einer Lösung mit
35 Faktor VIII:C-Aktivität eine Aminosäure oder eines ihrer

Salze oder Derivate und gegebenenfalls ein organisches Polymer oder ein Detergenz zugesetzt wird.

Die vorteilhafte Wirkung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann beispielsweise für eine über Chromatographie an monoklonalen Anti-F VIII:C-Antikörpern gereinigte F VIII:C-Präparation gezeigt werden, wobei der F VIII:C sowohl aus Plasma gewonnen als auch gentechnisch z.B. in CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen hergestellt sein kann. Dabei wird das Eluat der monoklonalen Antikörpersäule beispielsweise zu gleichen Teilen mit einer Lösung der obengenannten Substanzen versetzt und anschließend gegen diese Lösung dialysiert. Die so erhaltene stabilisierte F VIII:C-Präparation läßt sich unter geringen methoden-bedingten Verlusten sterilfiltrieren und abfüllen. Ein Lyophilisat dieser so erhaltenen Präparation zeigt nach Lösen unverändert hohe F VIII:C-Aktivitäten.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine VHP-F VIII:C-Präparation hergestellt werden, deren spezifische Volumenaktivität mindestens 200 IU/ml beträgt, bei einer spezifischen Aktivität von größer als 2000 IU/mg. Diese Konzentration gewährleistet eine problemlose Handhabung durch geringe zu applizierende Volumen.

Eine solche Präparation bedarf keiner weiteren Stabilisierung durch Proteine, wodurch die Gefahr von Viruskontaminationen vermieden wird. Zugleich wird durch die Verringerung der hohen Proteinfracht, die durch die Zugabe des für die Arzneiwirkung unnötigen Albumins und der darin enthaltenden unerwünschten Verunreinigungen das Immunsystem des Patienten wesentlich entlastet.

Da physiologisch verträgliche Substanzen zur Stabilisierung zugesetzt werden, treten bei der Applikation der erfindungsgemäßen Lösung keine Unverträglichkeitsreaktionen auf.

Beispiel 1:

Es wurden zwei VHP- VIII:C-Präparationen hergestellt, sowohl mittels Affinitätschromatographie an monoklonalen Anti-vWF-Ig (nach Fulcher & Zimmermann PNAS (1982), 79, 1649) und Dissoziation des vWF/F VIII:C-Komplex durch Lösung mit einer CaCl_2 -Konzentration von 300 mM in 0.1 M Acetat, 0.1 M Lysin, pH 6.8 (Eluat I) als auch mittels Chromatographie an monoklonalen Anti-F VIII:C-Ig und Elution des F VIII:C durch 50 % Ethylenglykol in 0.1 M Acetat, 0.1 M Lysin, pH 6.8 (Eluat II). Im Eluat I wurde eine spezifische F VIII:C-Aktivität von 2500 IU/mg und 419 IU/ml und im Eluat II von 3280 IU/mg und 454 IU/ml bestimmt. Beide Eluate wurden jeweils geteilt. Ein Teil wurde je im Volumenverhältnis 1:1 mit einer 1 %igen Human-Albumin-Lösung in 0.75 % Saccharose, 3 % Glycin und 0.1 Mol/l NaCl versetzt (Eluat I_{HSA}, Eluat II_{HSA}). Die jeweils andere Hälfte wurde ebenfalls 1:1 mit dem Stabilisierungspuffer (0.75 % Saccharose, 3 % Glycin, 3 % Arginin, 0.05 % ^RTween 80, pH 6.8) versetzt (Eluat I_S, Eluat II_S). Die Albumin enthaltenden Proben wurden gegen 0.75 % Saccharose, 3 % Glycin, 0.1 Mol/l NaCl, pH 6.8 dialysiert, die anderen gegen Stabilisierungspuffer. Die Dialyse fand bei 4°C für 16 Stunden und 1000-fachem Volumenwechsel statt. Die F VIII:C-Aktivitäten wurden vor und nach der Dialyse gemessen. Aufgeführt ist in Tabelle 1 die F VIII:C-Aktivität in % bezogen auf die Gesamt-F VIII:C-Aktivität der jeweiligen Probe vor Dialyse.

Tabelle 1

Eluat I _{HSA}	—	Eluat I _S	—	Eluat II _{HSA}	—	Eluat II _S
92	—	94	—	94	—	93
	—		—		—	

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Stabilisierung der VHP-F VIII:C-Eluate mittels der erfindungsgemäßen Stabilisierungslösung unabhängig von der Präparationsmethode und im gleichen Maße wie durch Albumin-Zusatz erreicht wird.

5

Beispiel 2:

Es wurde ein F VIII:C-Eluat nach Immunaффinitätschromatographie an monoklonalen Anti-F VIII:C-Antikörpern mit einer spezifischen F VIII:C-Aktivität von 3860 IU/mg Protein und 462 IU/ml gewonnen. Diese wurde im Volumenverhältnis 1 : 1 mit verschiedenen Stabilisierungslösungen versetzt und gegen die jeweilige Stabilisierungslösung, wie im Beispiel 1 beschrieben, dialysiert. In allen Lösungen wurde ggfs. mit 10 % Essigsäure ein pH-Wert von 6.8 eingestellt.

Folgende Stabilisierungslösungen wurden eingesetzt:

20

I. 0.75 % Saccharose, 0.4 M Glycin, 0.15 M Natriumchlorid

25

II. 0.01 M Natriumcitrat, 0.08 M Glycin, 0.016 M Lysin, 0.0025 M Calciumchlorid, 0.4 M Natriumchlorid

30

III. 1 % Saccharose, 0.14 M Arginin, 0.1 M Natriumchlorid

IV. 1 % Saccharose, 0.4 M Glycin, 0.14 M Arginin,
0.1 M Natriumchlorid, 0.05 % Tween 80

Die F VIII:C-Aktivität wurde vor und nach der Dialyse
5 bestimmt. Aufgetragen in % wurde in Tabelle 2 die F
VIII:C-Aktivität nach Dialyse bezogen auf die jeweilige
Aktivität vor Dialyse.

10 **Tabelle 2**

Ansatz	I	II	III	IV
F VIII:C-Akti- 15 vität nach 16 Stunden Dialyse	39,3 %	35.1 %	82.4 %	96.2 %

Die unter I und II eingesetzten Lösungen können zur
20 Stabilisierung von Albumin-freien HP-F VIII-Präparaten
mit spezifischen F VIII:C-Aktivitäten von 100 - 200
IU/mg unter Verzicht auf Albumin-Zusatz eingesetzt
werden. Zur Stabilisierung von VHP-F VIII-Präparationen
mit spezifischen F VIII:C-Aktivitäten größer als 1000
25 IU/mg sind die Lösungen III und IV geeignet.

Patentansprüche:

1. Eine Lösung mit Faktor VIII:C-Aktivität ent-
haltend eine Aminosäure oder eines ihrer Salze
oder Derivate und gegebenenfalls ein Detergenz
oder ein organisches Polymer.
2. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Aminosäure eine natürliche Aminosäure
ist.
3. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Aminosäure eine basische Aminosäure ist.
4. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß sie Arginin und Glycin enthält.
5. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Konzentration der Aminosäure 0.001 bis
1 mol/l ist.
6. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein organisches Polymer oder ein nicht-
ionisches Detergenz enthält.
7. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die F VIII:C-Aktivität von humanem Faktor
VIII in seiner im Plasma vorkommenden Form oder
einem gentechnisch hergestellten Faktor VIII:C
oder einem Derivat von diesen herrührt.
8. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die spezifische F VIII:C-Aktivität minde-
stens 1000 IU/mg beträgt.

9. Arzneimittel enthaltend eine Lösung nach Anspruch 1.
- 5 10. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es übliche, pharmazeutisch verträgliche, stabilisierende und/oder puffernde Substanzen enthält.
- 10 11. Arzneimittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kohlenhydrat enthält.
- 15 12. Verfahren zur Herstellung einer Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer Lösung mit Faktor VIII:C-Aktivität eine Aminosäure oder eines ihrer Salze oder Derivate und gegebenenfalls ein organisches Polymer oder ein Detergenz zugesetzt wird.

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

91/B 008 - Ma 888

Dr. Ha/Sd

Zusammenfassung

Stabilisierte Faktor VIII-Präparationen

- Die Erfindung betrifft stabilisierte Lösungen mit
- 5 F VIII-Koagulationsaktivität, ein Verfahren zu ihrer
Herstellung sowie ihre Verwendung.